

METHOD FOR DISCRIMINATING OF BEER BY LACTOBACILLUS BREVIS BY USING GYRASE GENE

Publication number: JP2003250557

Publication date: 2003-09-09

Inventor: NAKAKITA YASUICHI

Applicant: SAPPORO BREWERIES

Classification:

- international: C12N15/09; C12Q1/02; C12Q1/68; C12N15/09;
C12Q1/02; C12Q1/68; (IPC1-7): C12N15/09; C12Q1/02;
C12Q1/68

- european:

Application number: JP20020054070 20020228

Priority number(s): JP20020054070 20020228

Report a data error here

Abstract of JP2003250557

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a method for rapidly and accurately discriminating whether or not a test bacterium belonging to a *Lactobacillus brevis* strain is a strain having proliferation potency, i.e., beer turbidity.

SOLUTION: The discrimination of the beer turbidity is carried out based on a cleavage pattern by a restriction enzyme, obtained by amplifying a part of a B-gene region of the test *Lactobacillus brevis* strain by using as DNA gyrase subunit B gene (*gyrB*)-specific primer, and cleaving the amplified DNA fragment by the restriction enzyme.

COPYRIGHT: (C)2003,JPO

~~~~~  
Data supplied from the *esp@cenet* database - Worldwide

Best Available Copy

3/4

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号  
特開2003-250557  
(P2003-250557A)

(43) 公開日 平成15年9月9日(2003.9.9)

| (51) Int.Cl.  | 識別記号  | F I           | テーマコード(参考)  |
|---------------|-------|---------------|-------------|
| C 1 2 N 15/09 | Z N A | C 1 2 Q 1/02  | 4 B 0 2 4   |
| C 1 2 Q 1/02  |       | 1/68          | A 4 B 0 6 3 |
| 1/68          |       | C 1 2 N 15/00 | Z N A A     |

審査請求 未請求 請求項の数10 O L (全 9 頁)

(21) 出願番号 特願2002-54070(P2002-54070)

(22) 出願日 平成14年2月28日(2002.2.28)

(71) 出願人 000002196

サッポロビール株式会社

東京都渋谷区恵比寿四丁目20番1号

(72) 発明者 中北 保一

静岡県焼津市岡当目10 サッポロビール株  
式会社醸造技術研究所内

(74) 代理人 100088155

弁理士 長谷川 芳樹 (外3名)

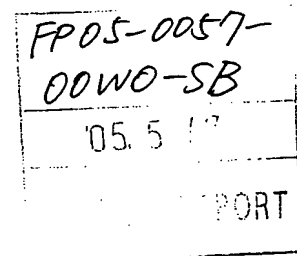
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ジャイレース遺伝子を用いてラクトバチルス・ブレビス菌のビール混濁性を判定する方法

(57) 【要約】

【課題】 ラクトバチルス・ブレビス種に属する被検菌について、ビール中での増殖能力、すなわちビール混濁性を有する株であるか否かを、迅速かつ正確に判定する方法を提供すること。

【解決手段】 DNAジャイレースサブユニットB遺伝子(gyrB) 特異的プライマーを用いて、被検ラクトバチルス・ブレビス菌株の該B遺伝子領域の一部を増幅して、得られた増幅DNA断片を制限酵素で切断し、得られた制限酵素切断パターンに基づき、そのビール混濁性の判定を行う。



## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 被検ラクトバチルス・ブレビス (*Lactobacillus brevis*) 菌株のビール混濁性を判定する方法であって、DNAジャイレースサブユニットB遺伝子 (*gyrB*) 特異的プライマーを用いて、前記被検ラクトバチルス・ブレビス菌株の該B遺伝子領域の一部を増幅し、得られた増幅DNA断片を制限酵素で切断し、得られた制限酵素切断パターンに基づき、該菌株のビール混濁性の判定を行うことを特徴とする前記方法。

【請求項2】 前記DNAジャイレースサブユニットB遺伝子 (*gyrB*) 特異的プライマーが、配列表の配列番号1に記載の核酸配列からなるオリゴヌクレオチドと配列表の配列番号2に記載の核酸配列からなるオリゴヌクレオチドとのセットである請求項1に記載の方法。

【請求項3】 制限酵素がHinf I、Apa I、およびHae IIIの組み合わせである請求項2に記載の方法。

【請求項4】 制限酵素切断パターンが4つに分類される請求項3に記載の方法。

【請求項5】 被検ラクトバチルス・ブレビス菌株の制限酵素切断パターンが、ラクトバチルス・ブレビス標準株VT-64029の属する分類に当てはまるとき、該被検ラクトバチルス・ブレビス菌株をビール混濁性株であると判定する請求項4に記載の方法。

【請求項6】 予めビール混濁性株を少なくとも1つ含むラクトバチルス・ブレビス標準株群の制限酵素切断パターンを取得し、被検ラクトバチルス・ブレビス菌株の制限酵素切断パターンと比較して、ビール混濁性の判定を行う請求項1に記載の方法。

【請求項7】 前記取得されたラクトバチルス・ブレビス標準株群の制限酵素切断パターンを分類し、ビール混濁性株が属する分類を特定するステップをさらに含む請求項6に記載の方法。

【請求項8】 被検ラクトバチルス・ブレビス菌株の制限酵素切断パターンが前記特定された分類に当てはまるとき、該被検ラクトバチルス・ブレビス菌株をビール混濁性株であると判定する請求項7に記載の方法。

【請求項9】 配列表の配列番号3、配列番号4、配列番号5および配列番号6に記載の核酸配列からなる群より選択される核酸配列を有するオリゴヌクレオチド。

【請求項10】 配列表の配列番号1に記載の核酸配列からなるオリゴヌクレオチドと配列表の配列番号2に記載の核酸配列からなるオリゴヌクレオチドとのセットからなるDNAジャイレースサブユニットB遺伝子 (*gyrB*) 増幅用プライマーセット。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、被検体であるラクトバチルス・ブレビス (*Lactobacillus brevis*) 菌株のビール混濁性を判定する方法に関する。さらに詳しくは、被検ラクトバチルス・ブレビス菌株のDNAジャイレ

ースサブユニットB遺伝子 (*gyrB*) の一部をPCRによって増幅し、その増幅断片の制限酵素切断パターンを指標として、前記被検ラクトバチルス・ブレビス菌株のビール混濁性を判定する方法に関する。

## 【0002】

【従来の技術】 ビール製造工程中に、ある種の乳酸菌が混入すると、混濁や酸敗などを起こし製造されたビールの品質を損なう危険性が知られている。特に、ラクトバチルス・ブレビス (*Lactobacillus brevis*) が代表的なビール混濁性菌である。しかしながら、これらの種に属する全ての株が、ビールに混濁を引き起こす性質（以下、「ビール混濁性」という）を有している訳ではない。そこで、被検菌がラクトバチルス・ブレビス種であるか否かを判定するだけでなく、該被検菌株がビール混濁性を有する株であるか否かについても識別し、菌株に応じた対策を立案、実施する必要がある。その一つの方法として、抗血清を用いたビール混濁性を有するラクトバチルス・ブレビスの検出法が提案されている（特開平10-104238号公報）。しかし、この方法では、増殖した培地成分の影響によって、ラクトバチルス・ブレビスの表面抗原の発現に影響が出ることが考えられ、誤判定を起こす可能性が生じるという問題があった。また、ホップやホップのイソ $\alpha$ 酸に対する耐性を調べて、乳酸菌等のビール混濁性を判定する方法（特開平9-260号公報、Fernandez, J.L. et al. ; Letters in Applied Microbiol., 1992, 14:13-16）も提案されているが、この方法では試験条件が判定結果に影響する可能性がある他、被検菌のビール中での増殖性を正確に判定することが困難であった。さらに、ラクトバチルス・ブレビスのD-乳酸脱水素酵素のポリアクリルアミド電気泳動での移動度から、該微生物が混濁性を有するグループか否かを判定する方法（特開平9-900894号公報）も提案されているが、判定までに時間がかかるという問題があった。また、遺伝子レベルでの各種菌株の同定・検出に用いられている16S rRNAでは、ラクトバチルス・ブレビス種間の正確な菌の分子系統学的な解析が不可能であった。すなわち、ビール混濁性を有する菌株とビール混濁性を有さない菌株との識別は、ここでも困難であった。

## 【0003】

【発明が解決しようとする課題】 上記の問題点に鑑み、従来技術の手法とは別の観点から、最も、ビール製造において脅威となるラクトバチルス・ブレビス種について、ビール中で増殖可能な株か否かを判定する方法の開発が望まれている。したがって、本発明の目的は前記の課題を解決し、ラクトバチルス・ブレビスと同定された被検菌株について、ビール中で増殖する能力があるか、つまりそのビール混濁性の有無について、迅速かつ正確に判定する方法を提供することである。

## 【0004】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、かかる課題を解決すべく検討を重ね、その過程でDNAジャイレースサブユニットB遺伝子 (*gyrB*) 遺伝子 (以下、*gyrB* 遺伝子ともいう) に着目した。さらに、生理学、生化学および遺伝子的な手法からラクトバチルス・ブレビスと特定された菌株の *gyrB* 遺伝子の一部をPCR手法により増幅すると、その増幅断片の制限酵素切断パターンが大きく4つのグループに分類することができ、しかもビール混濁性を有する株がその内の1つのグループに集中することを見出し、この知見に基づいて本発明を完成するに至った。

【0005】すなわち、本発明は、被検ラクトバチルス・ブレビス (*Lactobacillus brevis*) 株のビール混濁性を判定する方法であって、DNAジャイレースサブユニットB遺伝子 (*gyrB*) 特異的プライマーを用いて、前記被検ラクトバチルス・ブレビス菌株の該B遺伝子領域の一部を増幅し、得られた増幅DNA断片を制限酵素で切断し、得られた制限酵素切断パターンに基づき、ビール混濁性の判定を行うことを特徴とする前記方法を提供する。

【0006】上記方法において、好ましくはDNAジャイレースサブユニットB遺伝子 (*gyrB*) 特異的プライマーが、配列表の配列番号1に記載の核酸配列からなるオリゴヌクレオチドと配列表の配列番号2に記載の核酸配列からなるオリゴヌクレオチドとのセットである。

【0007】また、上記方法において、好ましくは制限酵素がHinf I、ApaI、およびHae IIIの組み合わせである。この場合、制限酵素切断パターンが4つに分類される。

【0008】前記方法において、被検ラクトバチルス・ブレビス菌株の制限酵素切断パターンが、ラクトバチルス・ブレビス標準株VTT-E64029の属する分類に当てはまるとき、該被検ラクトバチルス・ブレビス株をビール混濁性株であると判定する。

【0009】また、本発明は、上記方法において、予めビール混濁性株を少なくとも1つ含むラクトバチルス・ブレビス標準株群の制限酵素切断パターンを取得し、被検ラクトバチルス・ブレビス菌株の制限酵素切断パターンと比較して、ビール混濁性の判定を行うことを特徴とする。

【0010】前記方法において、好ましくは、取得されたラクトバチルス・ブレビス標準株群の制限酵素切断パターンを分類し、ビール混濁性株が属する分類を特定するステップをさらに含む。この場合、被検ラクトバチルス・ブレビス菌株の制限酵素切断パターンが前記特定された分類に当てはまるとき、該被検ラクトバチルス・ブレビス菌株をビール混濁性株であると判定する。

【0011】さらに、本発明は配列表の配列番号3、配列番号4、配列番号5および配列番号6に記載の核酸配列からなる群より選択される核酸配列を有するオリゴヌ

クレオチドを提供する。これらのオリゴヌクレオチドは、由来する各ラクトバチルス・ブレビス株に特徴的な核酸配列、つまり配列番号3、配列番号4、配列番号5、または配列番号6に記載の核酸配列によって特徴付けられる。

【0012】加えて、本発明は、上記いずれかの方法に使用できる、DNAジャイレースサブユニットB遺伝子 (*gyrB*) 増幅用プライマーセットを提供し、それは配列表の配列番号1に記載の核酸配列からなるオリゴヌクレオチドと配列表の配列番号2に記載の核酸配列からなるオリゴヌクレオチドとのセットからなる。

【0013】

【発明の実施の形態】本明細書で使用する、「ビール混濁性」とはビール中で被検ラクトバチルス・ブレビス菌株が増殖可能であり、増殖によりその菌株がビールの混濁を引き起こす性質をいう。

【0014】本発明は、被検ラクトバチルス・ブレビス菌株のビール混濁性を判定するために、オリゴヌクレオチドプライマーを用いたPCRによる遺伝子増幅法と、増幅断片を制限酵素により切断後、アクリルアミドゲル電気泳動によるパターン解析を行うことを基礎としている。

【0015】前述のように、ラクトバチルス・ブレビスと特定された菌株の全てがビール中で増殖するのではなく、一部の菌株のみがビール中で増殖することが可能である。このような有害菌株を判定、すなわち、被検菌株が有害菌株であるか否かを判定するのに、本発明はその菌株のDNAジャイレースサブユニットB遺伝子領域の約540bpの核酸配列を利用するものである。

【0016】ジャイレース (*gyrase*) は、細菌性のDNAトポイソメラーゼの一種であり、DNAの高次構造の修復等に関与しているとされている。DNAジャイレースは、2つのタンパク質からなり、そのタンパク質Aは、分子量100kDaで、タンパク質Bは、分子量90kDa若しくは70kDaである。近年、このタンパク質Bをコードする遺伝子 *gyrB* が各種細菌の分類に非常に有効であるとの報告がなされてきた (例えば、Watanabe, K., et al, Appl. Environ. Microbiol. 61, 1104-1109 (1995) を参照)。

【0017】本発明に従えば、*gyrB* 特異的プライマーを用いて、被検ラクトバチルス・ブレビス菌株の *gyrB* 遺伝子領域の一部を増幅し、得られた増幅DNA断片を制限酵素で切断し、得られた制限酵素切断パターンに基づき、ビール混濁性の判定を行うことができる。ここで、ビール混濁性の判定は、予めビール混濁性株を少なくとも1つ含むラクトバチルス・ブレビス標準株群の制限酵素切断パターンを取得し、被検ラクトバチルス・ブレビスの制限酵素切断パターンと比較することによって行う。好ましい実施の形態では、まず前記取得されたラクトバチルス・ブレビス標準株群の制限酵素切断パターンを分類し、ビール混濁性株が属する分類を特定する。さ

らに、被検ラクトバチルス・プレビス菌株の制限酵素切断パターンが特定された分類に当てはまるかどうかを確認し、当てはまるとき、該被検ラクトバチルス・プレビス菌株をビール混濁性株であると判定する。

【0018】 gyrB特異的プライマーは、被検菌 gyrB 遺伝子内の標的核酸配列に特異的にアニールするプライマーであるが、そのプライマーセットの内、一方は非特異的にアニールするものであってもよい。ラクトバチルス・プレビス菌に対しては、好ましくは、配列表の配列番号1に記載の核酸配列からなるオリゴヌクレオチドと配列表の配列番号2に記載の核酸配列からなるオリゴヌクレオチドとのセットからなるプライマーセットを特異的プライマーとして使用する。

【0019】このようなプライマーで gyrB 遺伝子領域の一部をPCR増幅するが、そのPCR条件等は、標準的なものと実質的に異ならない。増幅後、得られた増幅DNA断片を制限酵素で切断し、例えば、アガロース電気泳動し、エチジウムブロミドで染色し、DNAの検出を行う。このようにして得られた制限酵素切断パターン

(DNAの電気泳動パターン)を菌株間で比較する。

【0020】好ましい実施の形態では、予めビール混濁性株を少なくとも1つ含むラクトバチルス・プレビス標準菌株群の制限酵素切断パターンを取得する。具体的には、下記の標準株を使用して、前記プライマーセットでPCR増幅、制限酵素切断、およびアガロース電気泳動と一連の操作を行う。また、好ましくは制限酵素として、Hin1 I、Apa1 I、およびHae1 I Iの組み合わせを使用するが、この特定の酵素の組み合わせには限定されない。ラクトバチルス・プレビス標準菌株群の制限酵素切断パターンがその中に含まれるビール混濁性株の判別・特定を可能にする組み合わせならば、おおよそ任意の組み合わせが可能であろう。得られた制限酵素切断パターンは、大きく4つのグループに分類することができ、ビール混濁性を有する株がその内の1つのグループに集中することが見出された。ここで使用した、標準株の代表例、制限酵素、およびグループ分類を表1に示す。

【0021】

【表1】

| グループ | 制限酵素   |        |        | 代表株 (菌株番号)  |
|------|--------|--------|--------|-------------|
|      | Hin1 I | Apa1 I | HaeIII |             |
| I    | —      | +      | +      | JCM1061     |
| IIa  | +      | +      | —      | VTT-E-64028 |
| IIb  | +      | +      | +      | VTT-E-64029 |
| III  | +      | —      | +      | JCM1170     |

JCM: Japan Collection of Microorganisms VTT: Technical Research Centre of Finland

【0022】上記の代表株は、いずれも菌株保存機関から容易に入手可能であり、それらの入手先は、菌株番号に示されている。

【0023】次いで、各グループの菌株について、ISO  $\alpha$  酸に対する耐性およびビール中での増殖能力を調べたところ、グループIIbに属するもののみに、ビール混濁性を認めた。従って、上記の制限酵素の組み合わせを使用すると、被検菌の制限酵素切断パターンがこの特定された分類（すなわち、グループIIb）に当てはまるかどうかを確認し、当てはまるとき、該被検菌をビール混濁性株であると判定することができる。

【0024】ビール工場等現場で、ビール混濁性を有するラクトバチルス・プレビス菌株を検出・同定するには、対象となる製品ビールをメンブレンフィルターでろ過して、フィルター上に存在する菌類を乳酸菌選択増殖培地（例えば、m-NBB培地）で培養した後、集菌して本発明の判定方法に供する。

【0025】

【実施例】以下、実施例を挙げて本発明をさらに具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

【0026】（実施例1） 供試菌の gyrB 遺伝子の増幅

プライマーセット [GYPF (配列番号1)、GYPR (配列番号2)] は、gyrB 遺伝子の一部約540bp [*Staphylococcus aureus* ATCC12600の gyrB 遺伝子 (GenBank登録No. D10489) の346番目の核酸から907番目の核酸に相当する] を増幅する。このプライマーセットによるラクトバチルス・プレビスの gyrB 遺伝子の増幅、およびその他の各種乳酸菌、さらに乳酸菌以外の供試菌の gyrB 遺伝子の増幅について検討した。

【0027】(ゲノムDNA調製) MRS寒天培地 (Difco社) に供試菌を植菌し、30℃、嫌気ボックス (タバイエスベック社、N<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub>:H<sub>2</sub>=90:5:5) 中で、2~5日間培養を行った菌を試験に供した。DNA抽出液PrepMan (商標) Ultra (アプライド・バイオシステム社) を用いて菌体からゲノムDNAを抽出した。

【0028】(PCR増幅) PCRアッセイはGeneAmp (商標) PCR System 9700 (アプライド・バイオシステム社) を用いて行った。反応液TaKaRa Ex Taq (商標) (寶酒造社) に上記DNA溶液、およびプライマーセットを加え、PCR反応を行った。この液はゲノムDNA100ng以上を含み、DNA変性は95℃、30秒、アニーリングは55℃、30秒、DNA伸長反応は72℃、45秒で35サイクル繰り返した。

【0029】(PCR産物の検出) PCR増幅に続いて、PCR産物の検出はゲル電気泳動によって行った。PCRサンプル5 $\mu$ lをポリアクリルアミドゲルに供した。DNAのバンドは、エチジウムブロマイド溶液で10分間染色後、紫外線照射して観察し、確認した。PCRアッセイで試験した菌株とそれらの増幅結果を表2に示す。

【0030】(PCR産物の核酸配列) 増幅した*gyrB*遺伝子の核酸配列の決定は、増幅断片の5'、3'部分をGYPFとGYPRを用いて、ABI PRISM(商標)dRhodamine Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction KitとジェネティックアナライザABI PRISM(商標)310(アプライド・バイオシステム社)で行った。

【0031】表2に示すように、GYPFとGYPRとのプライ

マーセットを用いたPCR法による約540bpの増幅断片は、ラクトバチルス・ブレビスの全ての株に確認できた。しかし、ラクトバチルス・ブレビス以外の幾種かの乳酸菌にも、約540bpの増幅断片が観察された。

【0032】さらに、ラクトバチルス・ブレビスJCM1061株、VTT-E-64028株、SBC8026株およびJCM1170株の540bp断片の核酸配列を決定し、5'側から452bpの核酸配列を比較したところ、菌株間で数核酸～数十核酸が異なっていることが判明した。それぞれの核酸配列を配列表の配列番号3、配列番号4、配列番号5、および配列番号6に示す。

【0033】

【表2】

| No. | 供試菌株                                                            | 菌株 No.      | ca540bp <i>gyrB</i> |
|-----|-----------------------------------------------------------------|-------------|---------------------|
| 1   | <i>Lactobacillus brevis</i>                                     | AHU1508     | +                   |
| 2   | <i>Lactobacillus brevis</i>                                     | JCM1170     | +                   |
| 3   | <i>Lactobacillus brevis</i>                                     | JCM1061     | +                   |
| 4   | <i>Lactobacillus brevis</i>                                     | JCM1065     | +                   |
| 5   | <i>Lactobacillus brevis</i>                                     | JCM1065     | +                   |
| 6   | <i>Lactobacillus brevis</i>                                     | JCM1059     | +                   |
| 7   | <i>Lactobacillus brevis</i>                                     | JCM1559     | +                   |
| 8   | <i>Lactobacillus brevis</i>                                     | VTT-E-78074 | +                   |
| 9   | <i>Lactobacillus brevis</i>                                     | VTT-E-64028 | +                   |
| 10  | <i>Lactobacillus brevis</i>                                     | VTT-E-64029 | +                   |
| 11  | <i>Lactobacillus brevis</i>                                     | VTT-E-85232 | +                   |
| 12  | <i>Lactobacillus brevis</i>                                     | SBC8347     | +                   |
| 13  | <i>Lactobacillus brevis</i>                                     | SBC8812     | +                   |
| 14  | <i>Lactobacillus brevis</i>                                     | SBC8026     | +                   |
| 15  | <i>Lactobacillus brevis</i>                                     | SBC8001     | +                   |
| 16  | <i>Lactobacillus brevis</i>                                     | SBC8002     | +                   |
| 17  | <i>Lactobacillus brevis</i>                                     | SBC8003     | +                   |
| 18  | <i>Lactobacillus malefermentans</i>                             | JCM1167     | +                   |
| 19  | <i>Lactobacillus coryniformis</i><br>subsp. <i>coryniformis</i> | JCM1164     | -                   |
| 20  | <i>Lactobacillus plantarum</i>                                  | JCM1142     | +                   |
| 21  | <i>Lactobacillus paracasei</i>                                  | JCM1171     | +                   |
| 22  | <i>Lactobacillus biferefermentans</i>                           | JCM1094     | +                   |
| 23  | <i>Lactobacillus rhamnosus</i>                                  | JCM1136     | -                   |
| 24  | <i>Lactobacillus lindneri</i>                                   | VTT-E-89362 | -                   |
| 25  | <i>Lactobacillus buchneri</i>                                   | JCM1115     | +                   |
| 26  | <i>Lactobacillus collinoides</i>                                | JCM1123     | -                   |
| 27  | <i>Lactobacillus hilgardii</i>                                  | JCM1155     | +                   |
| 28  | <i>Streptococcus lactis</i>                                     | IFO12007    | -                   |
| 29  | <i>Streptococcus faecalis</i>                                   | AHU1256     | +                   |
| 30  | <i>Enterococcus faecalis</i>                                    | JCM5803     | +                   |
| 31  | <i>Pediococcus dextrinicus</i>                                  | JCM5887     | +                   |
| 32  | <i>Pediococcus damnosus</i>                                     | JCM5886     | +                   |
| 33  | <i>Leuconostoc mesenteroides</i>                                | AHU1076     | -                   |
| 34  | <i>Leuconostoc mesenteroides</i>                                | ATCC23386   | -                   |

ATCC: American Type Culture Collection

IFO: Institute for Fermentation, Osaka

AHU: Faculty of Agriculture, Hokkaido University

SBC: Sapporo Breweries Collection

【0034】(実施例2) 供試菌株のグループ分け  
ラクトバチルス・ブレビス種の4菌株の核酸配列に相違がみられたことより、それぞれを識別できる制限酵素サイトを検索し、制限酵素Hinf I、Apa I、Hae I I Iを選び出した。

【0035】(約540bp増幅断片の制限酵素による切断) 実施例1で示したPCR増幅条件で、各種菌株の約

540bp断片を増幅した。この断片を含む反応液8.5 $\mu$ lに、10倍濃度の緩衝液1 $\mu$ lおよび酵素液0.5 $\mu$ lを加え、37°C、4時間～1晩の間、反応を行った。Hinf IおよびHae I I Iには緩衝液M、Apa Iには緩衝液Lを使用した(寶酒造社)。反応終了後、反応液5 $\mu$ lをポリアクリルアミドゲルに供し、DNAのバンドはエチジウムブロマイド溶液で10分間染色後、紫外線照射して観察し

た。各制限酵素で切断したパターンを図1および表1に従い、菌株の制限酵素切断パターンをグループ分けすると表3のようになる。

【0036】

【表3】

| グループ | 菌株          |             |             |         |         |  |
|------|-------------|-------------|-------------|---------|---------|--|
| I    | JCM1061     | JCM1065     | VTT-E-85232 |         |         |  |
| IIa  | JCM1059     | VTT-E-64028 |             |         |         |  |
| IIb  | VTT-E-64029 | SBC8001     | SBC8002     | SBC8003 | SBC8026 |  |
|      | SBC8347     | SBC8812     |             |         |         |  |
| III  | AHU1058     | JCM1170     | VTT-E-78074 |         |         |  |
| その他  | JCM1559     | JCM1167     | JCM1142     | JCM1171 | JCM1094 |  |
|      | JCM1115     | JCM1155     | AHU1256     | JCM5803 | JCM5887 |  |
|      | JCM5886     |             |             |         |         |  |

その他：Hinf I および ApaI で切断されないか、若しくは切断されたフラグメント長が異なる。

【0037】JCM1559株を除く、15株のラクトバチルス・プレビス菌はグループI、IIa、IIb、IIIの何れかのグループに分類された。また、ラクトバチルス・プレビス以外の菌株で、約540bpの断片が増幅された株については、増幅断片がHinf I および ApaI で切断されないか、されても切断長がラクトバチルス・プレビスのものとは明らかに異なっていたため、上記I～IIIの何れのグループにも属さないことが確認された。

【0038】（実施例3）ビール混濁性株の識別（イソα酸に対する耐性試験）ラクトバチルス・プレビス種に属する計16株について、イソα酸に対する耐性試験を以下の手順で行った。

【0039】MRS液体培地（Difco社）で培養した培養液を滅菌生理食塩水にて、濁度OD660が約0.1になるように調製した。この菌液0.1mlを、試験管に分注した、40ppmのイソα酸（Versuchsstation Schweiz Breuereien社）を含むMRS液体培地（pH5.2）10mlに添加し、嫌気ボッ

クス中、30℃、3～10日間培養を行い、その間に増殖が目視で確認されたものを、イソα酸耐性を有する株と判定した。この耐性試験結果を各菌株について表4に示す。

【0040】（ビール混濁試験）ラクトバチルス・プレビス種に属する前記と同一の計16株について、ビール混濁試験を以下の手順で行った。

【0041】MRS液体培地（Difco社）で培養した培養液を滅菌生理食塩水にて、濁度OD660が約0.1になるように調製した。この菌液0.1mlを、試験管に分注した市販のビール10mlに添加し、嫌気ボックス中、30℃、1～4週間培養を行い、その間にビールの混濁等を目視で確認した。培養期間中に、ビールの混濁が確認されたものを、ビール混濁性を有する株と判定した。このビール混濁試験結果を各菌株について表4に示す。

【0042】

【表4】

| No. | 菌株No.       | 制限酵素パターン | イソα酸耐性(40ppm) | ビール混濁性 |
|-----|-------------|----------|---------------|--------|
| 1   | JCM1061     | I        | —             | —      |
| 2   | JCM1065     | I        | —             | —      |
| 3   | VTT-E-85232 | I        | —             | —      |
| 4   | JCM1059     | IIa      | —             | —      |
| 5   | VTT-E-64028 | IIa      | —             | —      |
| 6   | VTT-E-64029 | IIb      | +             | —      |
| 7   | SBC8001     | IIb      | +             | +      |
| 8   | SBC8002     | IIb      | +             | +      |
| 9   | SBC8003     | IIb      | +             | +      |
| 10  | SBC8026     | IIb      | +             | +      |
| 11  | SBC8347     | IIb      | +             | +      |
| 12  | SBC8812     | IIb      | +             | +      |
| 13  | AHU1058     | III      | —             | —      |
| 14  | JCM1170     | III      | —             | —      |
| 15  | VTT-E-78074 | III      | —             | —      |
| 16  | JCM1559     | その他      | —             | —      |

＋：イソα酸若しくはビール中で増殖する

－：イソα酸若しくはビール中で増殖しない

【0043】表4の結果から明らかなように、ビール混濁試験において、ビール混濁性を有する株と判定された株はすべてグループIIbに属している。なお、グループIIbに属するVTT-E-64029株は、ビール混濁試験において非混濁性株と判定された。しかし、本菌株は、乳酸菌のビール混濁性を判定する指標の1つとして考えられ

ているイソα酸に耐性を示すことから、混濁性を示す生理状態に変化する可能性があると考えられる。したがって、グループIIbに属する菌株は、ビール混濁を起こす能力を有する可能性が非常に高い株である、と考えるのが妥当である。このように、実施例2において得られた制限酵素切断パターンに基づく分類とビール混濁性判

定試験として認められているビール混濁試験やイソ $\alpha$ 酸耐性試験の結果に基づく分類が良好な一致を示すことから、本発明の判定方法は後者に劣らない信頼性のあるビール混濁性判定方法となる。しかも、本発明の判定方法は、菌株のDNAさえ得られれば、約4~10時間程度で完了し、数日以上培養試験を必要とする従来技術の判定方法に比較して、判定時間の大幅な短縮をもたらす。

【0044】

【発明の効果】本発明によれば、ラクトバチルス・ブレ

ビス種と同定された菌株がビール中で増殖する能力（ビール混濁性）を有するか否かの判定を、従来技術の方法（例えば、ビール混濁試験やイソ $\alpha$ 酸耐性試験）よりも迅速、かつ正確に行うことができる。したがって、本発明の判定方法をビール工場における工程管理の指標として導入することにより、ビール製造工程における微生物管理に寄与することができる。

【0045】

【配列表】

-----SEQUENCE LISTING-----

```

<:110>: Sapporo Breweries Ltd.
<:120>: Method for determining the beer haze forming ability of a
        Lactobacillus brevis strain by utilizing its gyrase gene
<:130>: JP01-1916-SB
<:160>: 6
<:170>: PatentIn Ver. 2.1
<:210>: 1
<:211>: 21
<:212>: DNA
<:213>: Primer
<:400>: 1
ggwtayaarg twtcwgggtg t                                21
<:210>: 2
<:211>: 19
<:212>: DNA
<:213>: Primer
<:400>: 2
tcatgygtwc caccttcat                                    19
<:210>: 3
<:211>: 452
<:212>: Genomic DNA
<:213>: Lactobacillus brevis JCM1061
<:400>: 3
ttctgtgtct ccacgggtgg gggcatcggc cgttaatgcg ctgtctaccg acttggaagt 60
tcaggtcatt cgtggcggga aaaagtatgc catcgccitt gaccatggtc atgtgaagac 120
accaatgcac gtgattgaag agggctctacc acaagatcag cacggaacga tcgtgcactt 180
cttgccagat ccagatattt tccgagaaac gaccgtcttt gatattaaga cattgacgac 240
gcggtattcg gaactggcct tcttaacaa aggcttgcgg attactattc gtgatgaacg 300
tccggaaaag ccaacggaag aagatttcct ttacgaagcg ggtatccggc attacgtaga 360
ctatttgaac gaaaacaaag aaacgttatt tgaaccgccca atttacgtgg aagggaaga 420
aaacgttatt acggtggaag tcgcgttgca at                                452
<:210>: 4
<:211>: 452
<:212>: Genomic DNA
<:213>: Lactobacillus brevis VTT-E-64028
<:400>: 4
ttctgtgtct ccacgggtgg gggcatcggc cgttaatgcg ctgtctaccg acttggaagt 60
tcaggtcatt cgtggcggga aaaagtatgc catcgccitt gaccatggtc atgtgaagac 120
gccaatgcac gtgattgaag agggctctacc acaagatcag cacggaacga tcgtgcactt 180
cttgccagat ccagatattt tccgagaaac gaccgtcttt gatattaaga cattgacgac 240

```



```
gaggattcgg gaactggcct tcttaacaa aggcttgcg attactattc gtgatgaacg 300
tccggaaaag ccaacggaag aagatttcct ttacgaaggc ggtatccggc attacgtaga 360
ctatttgaac gaaaacaaag aaacgttatt tgaaccgcc atttacgtgg aagggaaga 420
aaacggtatt acggtggaag tcgcgttgca at 452
```

&lt;:210&gt;: 5

&lt;:211&gt;: 452

&lt;:212&gt;: Genomic DNA

&lt;:213&gt;: Lactobacillus brevis SBC 8026

&lt;:400&gt;: 5

```
----- ttctgtgtct ccacgggtgg gggcatcggc cgttaatgcg ctgtctaccg acttggaagt 60
tcaggtcatt cgtggcggga aaaagatgc catcgccctt gaccatggc atgtgaagac 120
gccaatgcac gtgattgaag aggtctacc acaagatcag cacggcacga tcgtgcactt 180
cttgccagat ccagatattt tccgagaac gaccgtcttt gatattaaga cattgacgac 240
gaggattcgg gaactggcct tcttaacaa aggcttgcg attactattc gtgatgaacg 300
tccggaaaag ccaacggaag aagatttcct ttacgaaggc ggtatccggc attacgtaga 360
ctatttgaac gaaaacaaag aaacgttatt tgaaccgcc atttacgtgg aagggaaga 420
aaacggtatt acggtggaag tcgcgttgca at 452
```

&lt;:210&gt;: 6

&lt;:211&gt;: 452

&lt;:212&gt;: Genomic DNA

&lt;:213&gt;: Lactobacillus brevis JCM1170

&lt;:400&gt;: 6

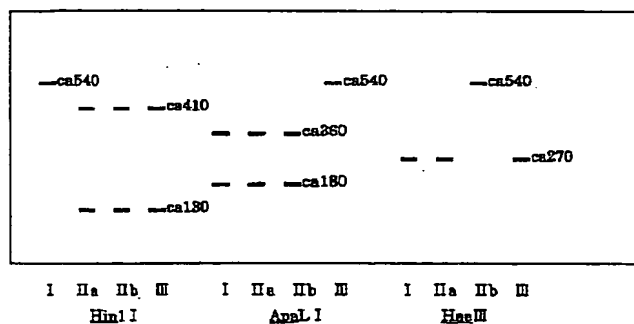
```
ttctgtgtct tcagggtgg gtgttcctt agttaacgcc ttgtctactg acttgagggc 60
gcaagtgaca cgtgatggca agacctatgc gattgccctt gaccacggcc acgttaagac 120
gccaatgcac gtgattaaag agggcctgcc acaagaccaa cacgggacgg cagttcactt 180
tttaccggac ccagatattt tccgagaac gaccgtcttt gatattaaga cattgacgac 240
gaggattcgg gaactggcct tcttaacaa aggcttgcg attactattc gtgatgaacg 300
tccggaaaag ccaacggaag aagatttcct ttacgaaggc ggtatccggc attacgtaga 360
ctatttgaac gaaaacaaag aaacgttatt tgaaccgcc atttacgtgg aagggaaga 420
aaacggtatt acggtggaag tcgcgttgca at 452
```

【図面の簡単な説明】

0bp増幅断片の制限酵素切断パターンを示す電気泳動模式図である。

【図1】 実施例2において得られた、各菌株からの約54

【図1】



## フロントページの続き

Fターム(参考) 4B024 AA11 CA04 CA05 CA09 EA04  
GA19 HA14  
4B063 QA01 QA12 QA18 QQ06 QQ44  
QR08 QR14 QR32 QR38 QR41  
QR55 QR62 QR66 QR69 QR75  
QR82 QS16 QS24 QS25 QS28  
QS34 QS36 QS39 QX02

---

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**